



2AC



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 102 51 244 A1 2004.05.19

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: 102 51 244.2

(22) Anmeldetag: 04.11.2002

(43) Offenlegungstag: 19.05.2004

(51) Int Cl.7: C12Q 1/25

(71) Anmelder:

Universität Heidelberg, 69117 Heidelberg, DE

(74) Vertreter:

Müller-Boré & Partner, Patentanwälte, European
Patent Attorneys, 81671 München

(72) Erfinder:

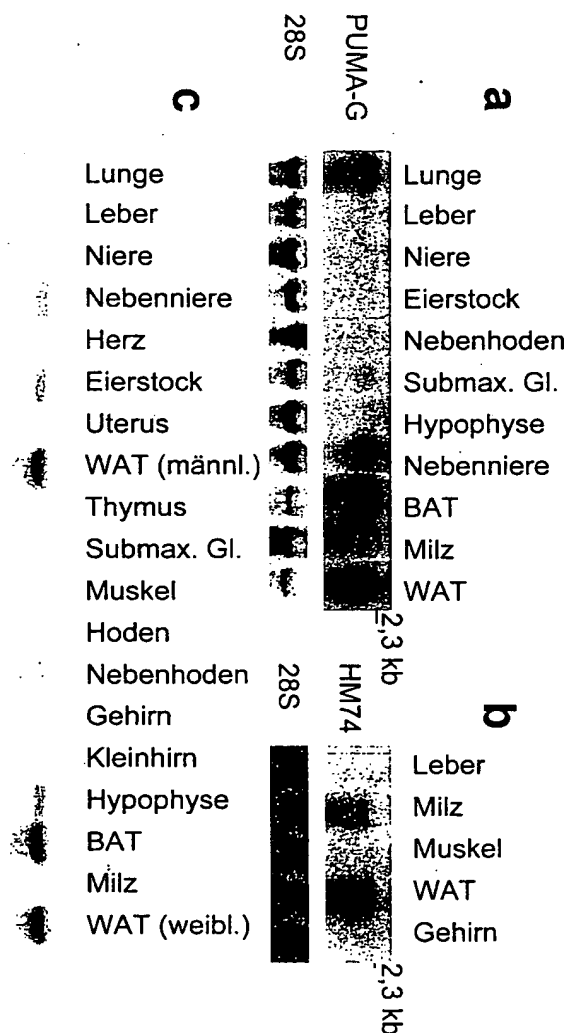
Tunaru, Sorin, 69120 Heidelberg, DE; Kero, Jukka,
69221 Dossenheim, DE; Blaukat, Andree Dr.,
69221 Dossenheim, DE; Offermanns, Stefan, Prof.
Dr., 69121 Heidelberg, DE

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: Verfahren zur Auffindung neuer antihyperlipidämischer Wirkstoffe (Lipidsenker) auf der Basis des Nikotinsäure-Rezeptors

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von antihyperlipidämisch wirkenden Verbindungen ("Lipidsenkern"), basierend auf einer Wechselwirkung der zu testenden Verbindungen mit einem Nikotinsäure-bindenden Protein ("Nikotinsäure-Rezeptor") oder einem biologisch aktiven Derivat davon, sowie einen auf diesem Verfahren basierenden Kit. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung dieses Nikotinsäure-Rezeptors oder eines biologisch aktiven Derivates davon als Bindungsprotein für antihyperlipidämisch wirkende Verbindungen.



BEST AVAILABLE COPY

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von antihyperlipidämisch wirkenden Verbindungen ("Lipidsenkern"), basierend auf einer Wechselwirkung der zu testenden Verbindungen mit einem Nikotinsäurebindenden Protein ("Nikotinsäure-Rezeptor") oder einem biologisch aktiven Derivat davon, sowie einen auf diesem Verfahren basierenden Kit. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung dieses Nikotinsäure-Rezeptors oder eines biologisch aktiven Derivates davon als Bindungsprotein für antihyperlipidämisch wirkende Verbindungen.

[0002] Wesentliche Risikofaktoren für die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen, die zu den häufigsten Erkrankungen in den Industrienationen zählen, stellen Fettstoffwechselstörungen dar, die erhöhte Lipidwerte in Patienten zur Folge haben. Eine der wichtigsten Behandlungsstrategien für kardiovaskuläre Erkrankungen ist daher die Behandlung dieser Patienten mit sogenannten Lipidsenkern.

[0003] Nikotinsäure ist der älteste bekannte Lipidsenker. Nikotinsäure verringert die Lipolyse im Fettgewebe (Carlson, Acta Med. Scand. 173: 719, 1963), was zu einer Abnahme der Triglycerid- und Cholesterinspiegel führt (Olsson, Handbook of Experimental Pharmacology Bd. 109 (Hrsg. Schettler & Habenicht) S. 349-400, 1994; Knopp, N. Engl. J. Med. 341: 498-511, 1999). Nachteilig bei der Behandlung mit Nikotinsäure ist, daß relativ hohe Dosen verabreicht werden müssen, die wahrscheinlich für die Entstehung von Nebenwirkungen mitverantwortlich sind. Insbesondere das "Flushing" – eine intensive Gesichtsröte, die subjektiv als unangenehme Hitze empfunden wird – und Hautirritationen sind vorübergehende, jedoch harmlose Nebenwirkungen, führen aber zu einer mangelnden Akzeptanz der Einnahme von Nikotinsäure bei Patienten.

[0004] Seit Ende der achtziger Jahre werden daher verstärkt HMG-CoA-Reduktasehemmer als Lipidsenker eingesetzt. In mehreren Arbeiten konnte auch ein positiver Effekt von Nikotinsäure als Zusatztherapie zu diesen HMG-CoA-Reduktasehemmern nachgewiesen werden (Braun et al., N. Engl. J. Med. 345: 1583-1592, 2001; Wink et al., Am. Heart. J. 143: 514-518, 2002). Der Vorteil von Nikotinsäure beruht darauf, daß Nikotinsäure die HDL-Cholesterin-Plasmakonzentration im Patienten um 15 bis 35% erhöht, während dieser Effekt bei den oben genannten HMG-CoA-Reduktasehemmern nur bei 5 bis 15% liegt (Olsson, supra; Knopp, supra).

[0005] Dementsprechend besteht ein Bedarf, neue Arzneimittel zu entwickeln, welche die antihyperlipidämische Wirkung von Nikotinsäure aufweisen, bei denen aber die oben genannten Nebenwirkungen fehlen. Dies erfordert ein detailliertes Verständnis des molekularen Mechanismus, auf welchem die Wirkung von Nikotinsäure beruht. Seit langem ist bekannt, daß die antihyperlipidämische Wirkung von Nikotinsäure primär auf der verringerten Lipolyse im Fettgewebe durch Hemmung der hormonsensitiven Triglycerid-Lipase basiert (Carlson, supra). Weitere Untersuchungen zeigten, daß diese antilipolytische Wirkung von Nikotinsäure auf der Hemmung der cAMP-Akkumulation im Fettgewebe durch Hemmung der Adenylatzyklase beruht, wobei die Wirkung durch Pertussistoxinsensitive G-Proteine des Gi-Typs vermittelt wird (Aktories et al., FEBS Lett. 115: 11-4, 1980; Lorenzen et al., Mol. Pharmacol. 59: 349-357, 2001). Der spezifische molekulare Rezeptor, an welchen die Nikotinsäure bindet, ist jedoch bisher nicht bekannt.

[0006] Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein neues System zur Auffindung antihyperlipidämisch wirkender Verbindungen bereitzustellen, welches auf dem molekularen Wirkmechanismus von Nikotinsäure basiert.

[0007] Diese Aufgabe wird durch die in den beigefügten Ansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen gelöst. Insbesondere wird ein Verfahren zum Nachweis von antihyperlipidämisch wirkenden Verbindungen bereitgestellt, umfassend

- (a) das Zugabe einer zu testenden bzw. zu untersuchenden Verbindung zu einem System, welches mindestens ein erstes Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz, ausgewählt aus SEQ-ID-Nr.1 und SEQ-ID-Nr.2, oder ein biologisch aktives Derivat davon enthält, und
- (b) das Bestimmen der antihyperlipidämischen Wirkung der in Schritt (a) zugegebenen Verbindung.

[0008] Das im erfindungsgemäß verwendeten System enthaltene erste Polypeptid als Bindungsprotein für antihyperlipidämisch wirkenden Verbindungen weist eine hohe Bindungsspezifität und -affinität zu Nikotinsäure auf und wird im Fettgewebe von Säugern stark exprimiert. Somit kann dieses erste Polypeptid auch als ein Rezeptor für Nikotinsäure betrachtet werden.

[0009] In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens umfaßt das System Zellen, vorzugsweise Säugerzellen, welche das erste Polypeptid enthalten. Der Begriff "Zellen" umfaßt gezüchtete Zellen, beispielsweise CHO-Zellen, COS7-Zellen, HeLa-Zellen, NIH3T3-Zellen oder HEK293-Zellen ("Human embryonic kidney"-Zellen, Subklon 293), und in einem Säuger enthaltene Zellen, beispielsweise in der Maus, Kaninchen oder Hund.

[0010] In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens enthalten die Zellen ferner ein zweites Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz, ausgewählt aus SEQ-ID-Nr. 3 oder SEQ-ID-Nr.4, oder ein biologisch aktives Derivat davon.

[0011] Die erfindungsgemäß verwendeten Zellen sind vorzugsweise Zellen, welche das erste und/oder zwei-

te Polypeptid stabil oder transient exprimieren. Der Begriff "stabile Expression" bedeutet, daß die Zellen mit einem geeigneten Expressionsvektor, welcher die für das erste und/oder zweite Polypeptid kodierende Nukleinsäuresequenz enthält, transfiziert werden und der Expressionsvektor oder Abschnitte des Expressionsvektors, welche die für das erste und/oder zweite Polypeptid kodierenden Nukleinsäuresequenzen, gegebenenfalls zusammen mit geeigneten, heterologen regulatorischen Sequenzen, enthalten, in das genetische Material der Zellen integriert werden. Der Begriff "transiente Expression" bedeutet, daß die Zellen mit einem Expressionsvektor, welcher die für das erste und/oder zweite Polypeptid kodierenden Nukleinsäuresequenzen enthält, transfiziert werden, wobei der Expressionsvektor oder Abschnitte davon nicht in das genetische Material der Zellen integriert werden. Erfindungsgemäß zu verwendende Expressionsvektoren mit geeigneten regulatorischen Sequenzen sind im Stand der Technik bekannt und/oder im Handel erhältlich, beispielsweise pcDNA3.1 (Invitrogen), pCMV (Stratagene) oder virale Expressionssysteme.

[0012] In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens können die Zellen ein Genprodukt bzw. Reporter-genprodukt enthalten, dessen Expression durch die Bindung einer antihyperlipidämisch wirkenden Verbindung an das erste Polypeptid direkt oder indirekt über eine Signalübertragungskaskade induziert wird. Beispielsweise kann durch die Bindung einer antihyperlipidämisch wirkenden Verbindung an das erste Polypeptid die für die Expression eines derartigen Reporter-genprodukts verantwortliche regulatorische Sequenz auf Transkriptionsebene aktiviert werden, wodurch die Expression des Reporter-genprodukts induziert wird. Reporter-genprodukte kodierende Nukleinsäuresequenzen können mit geeigneten, beispielsweise vorstehend beschriebenen Expressionsvektoren, in die Zellen eingeschleust werden. Selbstverständlich können auch Expressionsvektoren mit für das erste und/oder zweite Polypeptid kodierenden Nukleinsäuresequenzen und dem Reporter-gen verwendet werden. Beispiele für Reporter-genprodukte sind das "green fluorescent protein", das "green fluorescent protein" fusioniert mit Aequorin, β -Lactamase, Luziferase, Chloramphenicolacetyltransferase, β -Galactosidase und das menschliche Wachstumshormon. Beispiele für geeignete regulatorische Sequenzen in den Expressionsvektoren sind Promotoren, die durch Calcium oder Protein-Kinase C aktiviert werden können.

[0013] Erfindungsgemäß bedeutet der Begriff "biologisch aktives Derivat" jegliche proteinartige, modifizierte Verbindung, die sich von jeder der Sequenzen der SEQ-ID-Nrn. 1 bis 4 ableitet, mit im wesentlichen gleicher biologischer Funktion wie die in SEQ-ID-Nr. 1 bis 4 aufgelisteten Polypeptide; beispielsweise haben von den Sequenzen mit den SEQ-ID-Nrn. 1 und 2 abgeleitete Derivate eine im wesentlichen gleiche oder höhere Bindungsaffinität für Nikotinsäure und beispielsweise haben von den Sequenzen mit den SEQ-ID-Nrn. 3 und 4 abgeleitete Derivate eine im wesentlichen gleiche oder höhere Bindungsaffinität für das erste Polypeptid, sowie die im wesentlichen gleiche oder verbesserte Fähigkeit des zweiten Polypeptids nach Bindung einer antihyperlipidämisch wirkenden Verbindung an das erste Polypeptid, von diesem zu dissoziieren und an ein Effektor-enzym zu binden, das in seiner Aktivität gesteigert oder gehemmt wird. Die Modifikationen im biologisch aktiven Derivat können eine oder mehrere Deletionen, Substitutionen, Additionen von Aminosäuren auf genetischer und/oder posttranslati-onaler Ebene und/oder posttranslationale, chemische und/oder enzymatisch durchgeführte Modifikationen der Aminosäure-Seitenketten umfassen.

[0014] In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens umfaßt das System einen Träger, auf welchem mindestens das erste Polypeptid oder die vorstehend definierten Zellen oder Teile dieser Zellen, wie beispielsweise das erste Polypeptid enthaltende Zellmembranen, aufgebracht sind. Das Trägermaterial unterliegt keiner besonderen Einschränkung und kann jedes Material, wie beispielsweise Kunststoffe mit Polymeren oder Copolymeren als Bindemittel, glasartige Materialien oder Halbleitermaterialien, in jeglicher Form, wie beispielsweise kugelförmig, flächig und/oder porös ausgebildete Formkörper, sein. In einer Ausführungsform umfaßt das erfindungsgemäße verwendete System einen Biochip, auf welchem das erste Polypeptid oder die Zellen oder Teile dieser Zellen punktförmig, vorzugsweise in einer regelmäßigen Anordnung beispielsweise zur Computer-gesteuerten Auswertung, aufgebracht sind. Das erste Polypeptid kann nicht-kovalent oder kovalent an den Träger gebunden vorliegen.

[0015] Die zu testenden Verbindungen können in geeigneten Konzentrationen oder Konzentrationsreihen, abhängig von den Nachweisgrenzen des in Schritt (b) verwendeten Analyseverfahrens, zu dem entsprechenden System in Schritt (a) zugegeben werden. Die zu testenden Verbindungen können auch zur in Schritt (b) durchzuführenden Bestimmung eine Markierung, wie beispielsweise eine radioaktive, fluoreszierende oder immunologisch nachweisbare Markierung, aufweisen.

[0016] In Schritt (b) des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die antihyperlipidämische Wirkung der zu testenden Verbindung, basierend auf deren Bindungsaffinität an das erste Polypeptid bestimmt. Die Bestimmung der Bindungsaffinität sowie deren Auswertung hängt von dem in Schritt (a) erfindungsgemäß verwendeten System und der zu testenden Verbindung ab und kann beispielsweise spektroskopisch, z.B. fluorometrisch oder radiometrisch, immunologisch oder enzymatisch oder durch Hybridisierungsreaktionen, z.B. Northern Blot, oder mit einer geeigneten Kombination davon erfolgen.

[0017] Bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens sind nachstehend aufgelistet: In Schritt (a) umfaßt das System

- (i) Zellen, welche das erste Polypeptid enthalten oder
- (ii) Zellen, welche das erste Polypeptid und das zweite Polypeptid enthalten, oder
- (iii) Zellen, welche das erste Polypeptid, das zweite Polypeptid und eine Nukleinsäuresequenz, deren Expression durch Bindung von antihyperlipidämisch wirkenden Verbindungen an das erste Polypeptid unter Erhalt eines Reporterproduktes induziert wird, enthalten; oder
- (iv) das auf einen flächig ausgebildeten Träger punktförmig und in regelmäßiger Anordnung aufgebrachte erste Polypeptid ("Bio-Chip").

[0018] In Schritt (b) erfolgt die Bestimmung in den Zellen (i)–(iv) vorzugsweise

- durch das Messen der Bindungsaffinität und -spezifität der zu testenden Verbindung an das erste Polypeptid, oder
- durch die Messung der Aktivierung des G-Proteins bzw. der G-Protein-Signalkaskade über die Bindung einer zu testenden Verbindung an das erste Polypeptid als Nikotinsäure-Rezeptor.

[0019] Die Messung der Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Nikotinsäure-Rezeptoren umfaßt somit mindestens einen der folgenden Schritte:

- (A) das Binden einer antihyperlipidämisch wirkenden Verbindung an den Nikotinsäure-Rezeptor, wobei der Rezeptor aktiviert wird und seinerseits an ein G-Protein bindet,
- (B) den Austausch von GDP gegen GTP im G-Protein und die Dissoziation der α -Untereinheit von der β -, γ -Untereinheit im G-Protein oder (C) das Binden der aktivierten $G\alpha$ -Untereinheit an ein Effektorenzym, das in seiner Aktivität gesteigert oder gehemmt wird.

[0020] Beispielsweise erfolgt die Bestimmung in den Zellen (i) durch das Messen der Aktivierung der extrazellulär signal-regulierten Kinase (ERK) (Phosphorylierung) oder durch das Messen des intrazellulären cAMP-Spiegels, wobei die Zellen zusätzlich den β_2 -Adreno-Rezeptor (SEQ-ID-Nr. 5) exprimieren und der cAMP-Spiegel durch den β -Adreno-Rezeptor-Agonist Isoproterenol oder durch den Adenylcyclase-Stimulator Forskolin erhöht wird. In den Zellen (ii) erfolgt die Bestimmung beispielsweise durch das Messen des intrazellulären Ca-Anstiegs oder durch das Messen der Hemmung der hormon-sensitiven Triglycerid-Lipase. In den Zellen (iii) erfolgt die Bestimmung beispielsweise durch das Messen der Expression des induzierbaren Reporterproduktes.

[0021] Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft einen Kit zum Nachweis von antihyperlipidämisch wirkenden Verbindungen, welcher mindestens das vorstehend definierte, erfindungsgemäß verwendete System enthält. Der Kit kann ferner Mittel zur Durchführung der in Schritt (b) des erfindungsgemäßen Verfahrens beschriebenen Bestimmung enthalten. Derartige Mittel können beispielsweise anti-phospho-ERK-1/2-Antikörper, 3H -markierte Nikotinsäure, cAMP-spezifische Antikörper, cAMP-spezifische Bindungsproteine (z.B. die regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A), 3H -cAMP, α - ^{32}P -ATP (Messung der cAMP-Bildung durch Bestimmung des aus radioaktiv-markiertem ATP(α - ^{32}P)-ATP gebildeten ^{32}P -cAMP in Membranfraktionen nach säulenchromatographischer Trennung), jeweils in Abhängigkeit des in Schritt (a) verwendeten Systems, sein.

[0022] Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung des vorstehend definierten Systems, vorzugsweise des ersten Polypeptids, zur Bindung antihyperlipidämisch wirkender Verbindungen.

[0023] Mit dem erfindungsgemäß gekennzeichneten Verfahren ist es möglich, eine gezielte Suche nach neuen antihyperlipidämisch wirkenden Verbindungen durchzuführen. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die antihyperlipidämisch wirkenden Verbindungen im High-Throughput-Screening (HTS), bei dem voll automatisch und Roboter-unterstützt große Substanzzahlen mit Hilfe geeigneter Verfahren getestet werden, nachgewiesen, wobei das erste Polypeptid oder biologisch aktive Derivate davon als "Drug-Target" dienen. Dieses überraschende Ergebnis beruht auf der Erkenntnis, daß die in SEQ-ID-Nr. 1 und 2 dargestellten Polypeptide als im Säuger vorkommende Nikotinsäure-Rezeptoren betrachtet werden können.

[0024] Die Figuren zeigen:

[0025] **Fig. 1** zeigt die Expression des Nikotinsäure-Rezeptors in verschiedenen Geweben der Maus bzw. des Menschen (BAT = braunes Fettgewebe und WAT = weißes Fettgewebe, Submax. gl = submaxilläre Drüse), wobei (a) einen Northern Blot der Nikotinsäure-Rezeptor-mRNA der Maus ("PUMA-G") in verschiedenen Geweben der Maus, (b) einen Northern Blot der Nikotinsäurerezeptor-mRNA des Menschen ("HM74") in verschiedenen menschlichen Geweben und (c) einen Southern Blot mit cDNAs, die durch RT-PCR aus unterschiedlichen Geweben der Maus unter Verwendung von PUMA-G-spezifischen Primern erhalten werden, darstellt.

[0026] **Fig. 2** zeigt Liniendiagramme mit den konzentrationsabhängigen Beziehungen der intrazellulären Ca^{2+} -Änderungen [Ca^{2+}] in CHO-K1-Zellen ("Chinese hamster ovan cells", Subklon K1) nach Behandlung mit

Nikotinsäure, Acipimox, Pyrazine-2-carbonsäure und Furan-3-carbonsäure, wobei in (a) die Zellen das erste Polypeptid mit der SEQ-ID-Nr. 1 ("PUMA-G") und das zweite Polypeptid mit der SEQ-ID-Nr. 3 ($G\alpha_{15}$ -Protein) exprimieren und in (b) die Zellen das erste Polypeptid mit der SEQ-ID-Nr. 2 ("HM-74") und das zweite Polypeptid mit der SEQ-ID-Nr. 3 ($G\alpha_{15}$ -Protein) exprimieren. RLU sind die Relativen Lichteinheiten.

[0027] Fig. 3 zeigt Balkendiagramme, die den Effekt von Nikotinsäure (200 μ M) auf die intrazellulären cAMP-Spiegel in CHO-K1-Zellen, die den β_2 -Adreno-Rezeptor (SEQ-ID-Nr. 5) und den Nikotinsäure-Rezeptor exprimieren, graphisch darstellen, wobei in (a) der Nikotinsäure-Rezeptor der Maus ("PUMA-G") und in (b) der Nikotinsäure-Rezeptor des Menschen ("HM74") verwendet worden ist. Insbesondere wird der Effekt von Nikotinsäure auf den cAMP-Spiegel in Zellen untersucht, in welchen der cAMP-Spiegel durch Behandlung mit Isoproterenol (1 μ M) erhöht worden ist und die mit oder ohne Pertussistoxin (PTX) über Nacht vorbehandelt worden ist. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus einer Dreifachbestimmung.

[0028] Fig. 4 zeigt einen Western Blot, welcher den Effekt von Pertussistoxin (PTX) auf die Phosphorylierung von ERK in Zellen, welche den Nikotinsäure-Rezeptor der Maus ("PUMA-G") exprimieren und mit 200 μ M Nikotinsäure oder Acipimox behandelt werden, beschreibt.

[0029] Fig. 5 zeigt Liniendiagramme einer Rezeptor-Bindungsstudie des Nikotinsäure-Rezeptors, wobei (a) eine Sättigungsbindungsisotherme von 3 H-markierter Nikotinsäure in Zellmembranen von HEK293-Zellen, welche den Nikotinsäure-Rezeptor der Maus (PUMA-G) nach Transfektion exprimieren, (b) eine Sättigungsbindungsisotherme von 3 H-markierter Nikotinsäure in Zellmembranen von HEK293-Zellen, welche den humanen Nikotinsäure-Rezeptor ("HM74") nach Transfektion exprimieren, und (c) die Kompetitions-Bindungsstudien des Nikotinsäure-Rezeptors der Maus ("PUMA-G") beschreibt. Die leeren Kreise entsprechen der Gesamtbindung, die leeren Quadrate entsprechen der unspezifischen Bindung und die ausgefüllten Kreise entsprechen der spezifischen Bindung. Die Nebenbilder in (a) und (b) zeigen die Scatchard-Analyse der Bindungssättigungsisotherme von 3 H-Nikotinsäure. Ergebnisse sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus einer Dreifachbestimmung.

[0030] Durch die nachfolgenden Beispiele soll die vorliegende Erfindung näher erläutert werden, aber in keiner Weise beschränkt werden.

Beispiele

Beispiel 1: Expression des ersten Polypeptids mit der SEQ-ID-Nr. 1 bzw. 2 in Mausgewebe bzw. humanem Gewebe (im folgenden PUMA-G bzw. HM74 bezeichnet)

[0031] Gesamt-RNA (15 μ g) wird aus Mausgewebe oder humanem Gewebe von unterschiedlichen Organen bzw. Geweben isoliert (BioCat, Heidelberg, Germany), in denaturierenden 1%-Agarosegelen aufgetrennt und auf Nylonmembranen (Amersham) transferiert. Nach der Prähybridisierung werden die Membranen mit einer radioaktiv markierten cDNA-Sonde (gesamte kodierende Region PUMA-G bzw. HM74; spezifische Aktivität $> 1 \times 10^9$ cpm/ μ g) über Nacht inkubiert. Nach dem Waschen der Membranen wird die hybridisierte Sonde durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

[0032] Für die RT-PCR wird 1 μ g Gesamt-RNA aus unterschiedlichen Geweben der Maus isoliert. Anschließend wird die PUMA-G-cDNA mit Primern, die die gesamte kodierende Sequenz flankieren, in einer RT-PCR amplifiziert. Ein 395 bp-Fragment des Genes, welches das ribosomale Protein L19 kodiert, wird als Kontrolle coamplifiziert.

[0033] Wie aus Fig. 1 ersichtlich ist, kann eine hohe Expression von PUMA-G im Fettgewebe der Maus (vgl. Fig. 1a und 1c) bzw. HM-74 im menschlichen Fettgewebe (vgl. Fig. 1b) nachgewiesen werden. Die Expression von PUMA-G und HM74 ist sowohl im weißen Fettgewebe (WAT) wie im braunen Fettgewebe (BAT) hoch.

Beispiel 2: Herstellung der Expressionsvektoren für den PUMA-G- und HM74-Rezeptor

[0034] Die kodierende Region des PUMA-G- bzw. HM74-Rezeptors werden durch PCR mit cDNA bzw. genomischer DNA aus weißen Fettzellen unter Verwendung von Primern, welche die gesamte kodierende Sequenz flankieren, amplifiziert und in den Säugerexpressionsvektor pcDNA 3.1 (Invitrogen) inseriert.

Beispiel 3: PUMA-G und HM74 sind Rezeptoren für Nikotinsäure

[0035] PUMA-G- bzw. HM74-cDNA-Expressionsvektoren werden zusammen mit einem Expressionsvektor, der die Nukleinsäuresequenz für die $G\alpha_{15}$ -Untereinheit des G-Proteins (SEQ-ID-Nr. 3) kodiert, in CHO-K1-Zellen cotransfiziert, welche stabil ein Reportergenprotein exprimieren, dessen Fluoreszenz- bzw. Lumineszenzeigenschaften durch erhöhte Ca^{2+} -Spiegel messbar verändert werden. Das Reportergenprotein ist das "green fluorescent protein" (GFP) fusioniert mit Äquorin (Baubet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97; 7260–7265, 2000). Das $G\alpha_{15}$ -Protein kann durch eine Reihe von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (z.B. PUMA-G oder HM74)

aktiviert werden und aktiviert die Phospholipase C (PLC), die wiederum die intrazellulären Ca-Spiegel erhöht (Offermanns and Simon, J. Biol. Chem. 270: 15175–15180, 1995).

[0036] Für die Transfektion werden die Zellen in Platten mit 96 Vertiefungen überführt und mit den angegebenen cDNAs oder Kontroll-DNA (50 ng/Vertiefung) unter Verwendung des FuGENE6-Reagenz (Roche) transfiziert. 2 Tage nach der Transfektion werden die Zellen mit 5 μ M Coelenterazin h (Biotium) in Calciumfreier Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), die 10 mM HEPES (pH 7,4) enthält, für 3,5 h bei 37°C inkubiert. 45 Minuten vor der Zugabe der Nikotinsäure bzw. der Nikotinsäurederivate wird der Puffer durch HBSS, welcher 1,8 mM CaCl_2 enthält, ersetzt. Anschließend werden die Zellen mit Nikotinsäure und Derivaten davon behandelt. Nikotinsäure (Pyridin-3-carbonsäure), Pyrazin-2-carbonsäure, Furan-3-carbonsäure werden von Sigma erhalten, Acipimox (5-Methylpyrazin-2-carbonsäure-4-oxid) wird von Pharmacia-Upjohn erhalten. Die Calcium-Messungen werden unter Verwendung eines Luminometer-Plattenmessers (Luminoskan Ascent, Labsystems) durch Messung der RLU (relative light units = relative Lichteinheiten) durchgeführt.

[0037] Konzentrationsabhängig kann Nikotinsäure sowie deren Derivate die intrazellulären Ca-Spiegel erhöhen. Die Nikotinsäure-Konzentrationen, bei denen 50 % der maximalen Erhöhung der Ca-Spiegel auftritt (EC_{50} -Konzentrationen) liegen bei etwa 3 μ M für den Maus- und bei etwa 1 μ M für den menschlichen Rezeptor (vgl. Fig. 2a und b). Die Nikotinsäure hat keinen Einfluß auf untransfizierte Zellen oder Zellen, welche nur mit $\text{G}\alpha_{15}$ transfiziert werden. Die antihyperlipidämische Wirkung der verschiedenen Nikotinsäure-Strukturderivate (Acipimox, EC_{50} 2–5 μ M; Pyrazin-2-carbonsäure, EC_{50} 10 μ M; Furan-3-carbonsäure, EC_{50} > 100 μ M; vgl. Fig. 2a und b), die auf Basis der PUMA-G/ $\text{G}\alpha_{15}$ oder HM74/ $\text{G}\alpha_{15}$ vermittelten Calciumantwort erhalten wird, stimmt mit der Wirkung in Fettzellen überein, die durch Hemmung der Adenylatzyklase oder Stimulation der GTPy-S-Bindung ermittelt wird (Lorenzen et al., Mol. Pharmacol. 59: 349–357, 2000, Aktories et al., Arzneimittelforschung 33: 1525–1527, 1983).

Beispiel 4: Nikotinsäure aktiviert durch Bindung an den PUMA-G- bzw. HM74-Rezeptor einen Gi-Protein vermittelten Signalweg ("cAMP-Messung").

[0038] In diesem Beispiel wird die Aktivierung des PUMA-G- bzw. HM74-Rezeptors über Nikotinsäure durch Pertussistoxin-sensitive G-Proteine der G_i -Familie mittels Hemmung der Adenylatzyklase bestimmt. In CHO-K1-Zellen, welche transient mit einem PUMA-G- oder HM74-Expressionsvektor zusammen mit einem Expressionsvektor für den β_2 -Adrenorezeptor kotransfiziert werden, werden in Platten mit 6 Vertiefungen gezüchtet und die intrazellulären cAMP-Spiegel mit einem Radiorezeptorassay unter Verwendung von ^3H -cAMP (Amersham) unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen gemessen.

[0039] Nach Behandlung der Zellen mit Nikotinsäure (200 μ M) wird eine Abnahme der intrazellulären cAMP-Spiegel gemessen, welche durch den β -Adrenorezeptor-Agonisten Isoproterenol (1 μ M) erhöht worden sind. Die Hemmung der Adenylatzyklase durch den aktivierten PUMA-G- und HM74-Rezeptor kann vollständig durch die Vorbehandlung der Zellen mit Pertussistoxin (PTX, 100 ng/ml übernacht) gehemmt werden (vgl. Fig. 3a und b). Die Nikotinsäure hat keinen Einfluß auf die cAMP-Spiegel in untransfizierten Zellen. PUMA-G/HM74 sind nicht fähig, eine Nikotinsäure-abhängige Herstellung von Inositolphosphaten zu bewirken. Somit ist der PUMA-G- bzw. HM74-Rezeptor mit G-Proteinen vom G_i -Typ gekoppelt.

Beispiel 5: Nikotinsäure aktiviert durch Bindung an den PUMA-G- bzw. HM74-Rezeptor einen Gi-Protein vermittelten Signalweg ("ERK-Phosphorylierung").

[0040] In diesem Beispiel wird die Aktivierung des PUMA-G- bzw. HM74-Rezeptors über Nikotinsäure durch Pertussistoxin-sensitive G-Proteine der G_i -Familie über die Aktivierung der extrazellulär Signal-regulierten Kinase (ERK) bestimmt.

[0041] Nach 12 h Hungern werden CHO-K1-Zellen, welche transient mit cDNA von PUMA-G- oder HM74-Rezeptoren transfiziert worden sind, für 5 Minuten bei 37 °C mit 200 μ M Nikotinsäure oder Acipimox inkubiert. Die Zellen werden in Lysepuffer (50 mM Tris-HCL (pH 7,5), 150 mM Natriumchlorid, 5 mM EDTA, 1 % (v/v) NP-40, 0,5% (w/v) Natriumdesoxycholat, 0,1 % (w/v) SDS und Proteaseinhibitoren) lysiert, und die Proben werden durch Immunoblotting unter Verwendung von phosphonierungsspezifischen ERK1/2-Antikörpern (Cell signaling) und einem Elektrochemilumineszenz (ECL)-Detektionssystem (Roche) analysiert.

[0042] Die Aktivierung von ERK durch PUMA-G (Fig. 4) oder HM74 ist ebenfalls sensitiv gegenüber einer Vorbehandlung der Zellen mit Pertussistoxin (PTX, 100 ng/ml übernacht). Die Nikotinsäure hat keinen Einfluß auf die Phosphorylierung von ERK in untransfizierten Zellen. Dies ist ein weiterer Beweis, daß PUMA-G/HM74 mit G-Proteinen vom G_i -Typ gekoppelt sind.

Beispiel 6: Radioligand-Bindungsstudien mit ^3H -markierter Nikotinsäure an PUMA-G- bzw. HM74-Rezeptoren

[0043] Die Gleichgewichtsbindung von ^3H -markierter Nikotinsäure (American Radiolabeled Chemicals; 50

Ci/mmol) wird mit 30 µg Membranen aus HEK 293T-Zellen, welche PUMA-G oder HM74-Rezeptoren exprimieren, in einem Gesamtvolumen von 250 µl Bindungspuffer (50 mM Tris-HCL (pH 7,4), 2 mM MgCl₂, 0,02% (v/v) CHAPS) durchgeführt. Nach 4 h Inkubation bei 25°C wird die ungebundene und membrangebundene Radioaktivität mittels Filtration der Proben durch Nitrocellulosefilter, gefolgt von zwei Waschschritten mit 4 ml eiskaltem Bindungspuffer abgetrennt. Die unspezifische Bindung wird in Anwesenheit von 200 µM unmarkierter Nikotinsäure bestimmt. Die Kompetitionsbindungsanalyse wird in Anwesenheit von 60 nM ³H-Nikotinsäure durchgeführt.

[0044] Die Sättigungsbindungsanalysen zeigen, daß die aus HEK-293T-Zellen, welche mit PUMA-G und HM74 transfiziert sind, hergestellten Membranen eine sättigungsfähige und spezifische Bindung aufweisen (PUMA-G: Dissoziationskonstante K_d = 83,3 nM; HM74: K_d = 55,6 nM) (vgl. Fig. 5a und b). Die Kompetitions-Bindungsstudien (vgl. Fig. 5c) mit unterschiedlichen Nikotinsäureanalogen zeigen eine Affinitätsreihenfolge ähnlich zu der, die für die endogene Bindungsstelle beschrieben wird (Lorenzen et al., Mol. Pharmacol. 59: 349–357, 2001).

[0045] Die maximale antihyperlipidämische Wirkung von Nikotinsäure kann bei Plasmakonzentrationen von 4–16 µM beobachtet werden (Hotz, Adv.Lipid. Res. 20: 195–217; Svedmyr et. al., Clin. Pharmacol. Ther. 10: 559–570), und die maximale Plasma-Konzentration nach der Verabreichung einer pharmazeutischen Standarddosis liegt im Bereich von 500–300 µM (Carlson et al., Acta Med. Scand. 183: 457–465, 1968). Somit sind die EC₅₀-Werte für eine Nikotinsäure-induzierte intrazelluläre Calcium-Erhöhung durch Aktivierung des G-Protein-Rezeptors PUMA-G bzw. HM74 über die Gα₁₅-Untereinheit sowie die Bindungsaffinität und -spezifität für Nikotinsäure an den PUMA-G- bzw. HM74-Rezeptor in Übereinstimmung mit der Rolle von PUMA-G/HM74 bei der antihyperlipidämischen Wirkung der Nikotinsäure in vivo.

[0046] Die vorliegenden experimentellen Daten zeigen deutlich, daß PUMA-G/HM74 eine entscheidende Rolle für die antihyperlipidämische Wirkung von Nikotinsäure spielt.

SEQUENCE LISTING

<110> Universität Heidelberg

<120> Verfahren zur Auffindung neuer antihyperlipidämischer Wirkstoffe (Lipidsenker)

<130> H 2218

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 360

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Met	Ser	Lys	Ser	Asp	His	Phe	Leu	Val	Ile	Asn	Gly	Lys	Asn	Cys	Cys
1				5					10					15	

Val	Phe	Arg	Asp	Glu	Asn	Ile	Ala	Lys	Val	Leu	Pro	Pro	Val	Leu	Gly
			20					25					30		

Leu	Glu	Phe	Val	Phe	Gly	Leu	Leu	Gly	Asn	Gly	Leu	Ala	Leu	Trp	Ile
		35					40					45			

Phe	Cys	Phe	His	Leu	Lys	Ser	Trp	Lys	Ser	Ser	Arg	Ile	Phe	Leu	Phe
	50					55					60				

Asn	Leu	Ala	Val	Ala	Asp	Phe	Leu	Leu	Ile	Ile	Cys	Leu	Pro	Phe	Leu
65					70					75					80

Thr	Asp	Asn	Tyr	Val	His	Asn	Trp	Asp	Trp	Arg	Phe	Gly	Gly	Ile	Pro
				85					90					95	

Cys	Arg	Val	Met	Leu	Phe	Met	Leu	Ala	Met	Asn	Arg	Gln	Gly	Ser	Ile
			100					105					110		

Ile	Phe	Leu	Thr	Val	Val	Ala	Val	Asp	Arg	Tyr	Phe	Arg	Val	Val	His
		115					120					125			

DE 102 51 244 A1 2004.05.19

Pro His His Phe Leu Asn Lys Ile Ser Asn Arg Thr Ala Ala Ile Ile
130 135 140

Ser Cys Phe Leu Trp Gly Leu Thr Ile Gly Leu Thr Val His Leu Leu
145 150 155 160

Tyr Thr Asn Met Met Thr Lys Asn Gly Glu Ala Tyr Leu Cys Ser Ser
165 170 175

Phe Ser Ile Cys Tyr Asn Phe Arg Trp His Asp Ala Met Phe Leu Leu
180 185 190

Glu Phe Phe Leu Pro Leu Ala Ile Ile Leu Phe Cys Ser Gly Arg Ile
195 200 205

Ile Trp Ser Leu Arg Gln Arg Gln Met Asp Arg His Ala Lys Ile Lys
210 215 220

Arg Ala Ile Asn Phe Ile Met Val Val Ala Ile Val Phe Ile Ile Cys
225 230 235 240

Phe Leu Pro Ser Val Ala Val Arg Ile Arg Ile Phe Trp Leu Leu Tyr
245 250 255

Lys Tyr Asn Val Arg Asn Cys Asp Ile Tyr Ser Ser Val Asp Leu Ala
260 265 270

Phe Phe Thr Thr Leu Ser Phe Thr Tyr Met Asn Ser Met Leu Asp Pro
275 280 285

Val Val Tyr Tyr Phe Ser Ser Pro Ser Phe Pro Asn Phe Phe Ser Thr
290 295 300

Cys Ile Asn Arg Cys Leu Arg Lys Lys Thr Leu Gly Glu Pro Asp Asn
305 310 315 320

Asn Arg Ser Thr Ser Val Glu Leu Thr Gly Asp Pro Ser Thr Thr Arg
325 330 335

Ser Ile Pro Gly Ala Leu Met Ala Asp Pro Ser Glu Pro Gly Ser Pro
 340 345 350

Pro Tyr Leu Ala Ser Thr Ser Arg
 355 360

<210> 2
 <211> 387
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Asn Arg His His Leu Gln Asp His Phe Leu Glu Ile Asp Lys Lys
 1 5 10 15

Asn Cys Cys Val Phe Arg Asp Asp Phe Ile Ala Lys Val Leu Pro Pro
 20 25 30

Val Leu Gly Leu Glu Phe Ile Phe Gly Leu Leu Gly Asn Gly Leu Ala
 35 40 45

Leu Trp Ile Phe Cys Phe His Leu Lys Ser Trp Lys Ser Ser Arg Ile
 50 55 60

Phe Leu Phe Asn Leu Ala Val Ala Asp Phe Leu Leu Ile Ile Cys Leu
 65 70 75 80

Pro Phe Val Met Asp Tyr Tyr Val Arg Arg Ser Asp Trp Asn Phe Gly
 85 90 95

Asp Ile Pro Cys Arg Leu Val Leu Phe Met Phe Ala Met Asn Arg Gln
 100 105 110

Gly Ser Ile Ile Phe Leu Thr Val Val Ala Val Asp Arg Tyr Phe Arg
 115 120 125

Val Val His Pro His His Ala Leu Asn Lys Ile Ser Asn Trp Thr Ala
 130 135 140

Ala Ile Ile Ser Cys Leu Leu Trp Gly Ile Thr Val Gly Leu Thr Val

145		150		155		160									
His	Leu	Leu	Lys	Lys	Lys	Leu	Leu	Ile	Gln	Asn	Gly	Pro	Ala	Asn	Val
			165						170					175	
Cys	Ile	Ser	Phe	Ser	Ile	Cys	His	Thr	Phe	Arg	Trp	His	Glu	Ala	Met
			180					185					190		
Phe	Leu	Leu	Glu	Phe	Leu	Leu	Pro	Leu	Gly	Ile	Ile	Leu	Phe	Cys	Ser
			195				200						205		
Ala	Arg	Ile	Ile	Trp	Ser	Leu	Arg	Gln	Arg	Gln	Met	Asp	Arg	His	Ala
	210					215					220				
Lys	Ile	Lys	Arg	Ala	Ile	Thr	Phe	Ile	Met	Val	Val	Ala	Ile	Val	Phe
225					230					235					240
Val	Ile	Cys	Phe	Leu	Pro	Ser	Val	Val	Val	Arg	Ile	Arg	Ile	Phe	Trp
				245					250					255	
Leu	Leu	His	Thr	Ser	Gly	Thr	Gln	Asn	Cys	Glu	Val	Tyr	Arg	Ser	Val
			260					265					270		
Asp	Leu	Ala	Phe	Phe	Ile	Thr	Leu	Ser	Phe	Thr	Tyr	Met	Asn	Ser	Met
		275					280					285			
Leu	Asp	Pro	Val	Val	Tyr	Tyr	Phe	Ser	Ser	Pro	Ser	Phe	Pro	Asn	Phe
	290					295					300				
Phe	Ser	Thr	Leu	Ile	Asn	Arg	Cys	Leu	Gln	Arg	Lys	Met	Thr	Gly	Glu
305					310					315					320
Pro	Asp	Asn	Asn	Arg	Ser	Thr	Ser	Val	Glu	Leu	Thr	Gly	Asp	Pro	Asn
				325					330					335	
Lys	Thr	Arg	Gly	Ala	Pro	Glu	Ala	Leu	Met	Ala	Asn	Ser	Gly	Glu	Pro
			340					345					350		
Trp	Ser	Pro	Ser	Tyr	Leu	Gly	Pro	Thr	Ser	Asn	Asn	His	Ser	Lys	Lys

355

360

365

Gly His Cys His Gln Glu Pro Ala Ser Leu Glu Lys Gln Leu-Gly Cys
 370 375 380

Cys Ile Glu
 385

<210> 3
 <211> 374
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 3

Met Ala Arg Ser Leu Thr Trp Gly Cys Cys Pro Trp Cys Leu Thr Glu
 1 5 10 15

Glu Glu Lys Thr Ala Ala Arg Ile Asp Gln Glu Ile Asn Arg Ile Leu
 20 25 30

Leu Glu Gln Lys Lys Gln Glu Arg Glu Glu Leu Lys Leu Leu Leu
 35 40 45

Gly Pro Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Phe Ile Lys Gln Met Arg Ile
 50 55 60

Ile His Gly Val Gly Tyr Ser Glu Glu Asp Arg Arg Ala Phe Arg Leu
 65 70 75 80

Leu Ile Tyr Gln Asn Ile Phe Val Ser Met Gln Ala Met Ile Asp Ala
 85 90 95

Met Asp Arg Leu Gln Ile Pro Phe Ser Arg Pro Asp Ser Lys Gln His
 100 105 110

Ala Ser Leu Val Met Thr Gln Asp Pro Tyr Lys Val Ser Thr Phe Glu
 115 120 125

Lys Pro Tyr Ala Val Ala Met Gln Tyr Leu Trp Arg Asp Ala Gly Ile
 130 135 140

Arg Ala Cys Tyr Glu Arg Arg Arg Glu Phe His Leu Leu Asp Ser Ala
145 150 155 160

Val Tyr Tyr Leu Ser His Leu Glu Arg Ile Ser Glu Asp Ser Tyr Ile
165 170 175

Pro Thr Ala Gln Asp Val Leu Arg Ser Arg Met Pro Thr Thr Gly Ile
180 185 190

Asn Glu Tyr Cys Phe Ser Val Lys Lys Thr Lys Leu Arg Ile Val Asp
195 200 205

Val Gly Gly Gln Arg Ser Glu Arg Arg Lys Trp Ile His Cys Phe Glu
210 215 220

Asn Val Ile Ala Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Leu Ser Glu Tyr Asp Gln
225 230 235 240

Cys Leu Glu Glu Asn Asp Gln Glu Asn Arg Met Glu Glu Ser Leu Ala
245 250 255

Leu Phe Ser Thr Ile Leu Glu Leu Pro Trp Phe Lys Ser Thr Ser Val
260 265 270

Ile Leu Phe Leu Asn Lys Thr Asp Ile Leu Glu Asp Lys Ile His Thr
275 280 285

Ser His Leu Ala Thr Tyr Phe Pro Ser Phe Gln Gly Pro Arg Arg Asp
290 295 300

Ala Glu Ala Ala Lys Ser Phe Ile Leu Asp Met Tyr Ala Arg Val Tyr
305 310 315 320

Ala Ser Cys Ala Glu Pro Gln Asp Gly Gly Arg Lys Gly Ser Arg Ala
325 330 335

Arg Arg Phe Phe Ala His Phe Thr Cys Ala Thr Asp Thr Gln Ser Val
340 345 350

Arg Ser Val Phe Lys Asp Val Arg Asp Ser Val Leu Ala Arg Tyr Leu
 355 360 365

Asp Glu Ile Asn Leu Leu
 370

<210> 4
 <211> 374
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Arg Ser Leu Thr Trp Arg Cys Cys Pro Trp Cys Leu Thr Glu
 1 5 10 15

Asp Glu Lys Ala Ala Ala Arg Val Asp Gln Glu Ile Asn Arg Ile Leu
 20 25 30

Leu Glu Gln Lys Lys Gln Asp Arg Gly Glu Leu Lys Leu Leu Leu Leu
 35 40 45

Gly Pro Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Phe Ile Lys Gln Met Arg Ile
 50 55 60

Ile His Gly Ala Gly Tyr Ser Glu Glu Glu Arg Lys Gly Phe Arg Pro
 65 70 75 80

Leu Val Tyr Gln Asn Ile Phe Val Ser Met Arg Ala Met Ile Glu Ala
 85 90 95

Met Glu Arg Leu Gln Ile Pro Phe Ser Arg Pro Glu Ser Lys His His
 100 105 110

Ala Ser Leu Val Met Ser Gln Asp Pro Tyr Lys Val Thr Thr Phe Glu
 115 120 125

Lys Arg Tyr Ala Ala Ala Met Gln Trp Leu Trp Arg Asp Ala Gly Ile
 130 135 140

Arg Ala Tyr Tyr Glu Arg Arg Arg Glu Phe His Leu Leu Asp Ser Ala
145 150 155 160

Val Tyr Tyr Leu Ser His Leu Glu Arg Ile Thr Glu Glu Gly Tyr Val
165 170 175

Pro Thr Ala Gln Asp Val Leu Arg Ser Arg Met Pro Thr Thr Gly Ile
180 185 190

Asn Glu Tyr Cys Phe Ser Val Gln Lys Thr Asn Leu Arg Ile Val Asp
195 200 205

Val Gly Gly Gln Lys Ser Glu Arg Lys Lys Trp Ile His Cys Phe Glu
210 215 220

Asn Val Ile Ala Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Leu Ser Glu Tyr Asp Gln
225 230 235 240

Cys Leu Glu Glu Asn Asn Gln Glu Asn Arg Met Lys Glu Ser Leu Ala
245 250 255

Leu Phe Gly Thr Ile Leu Glu Leu Pro Trp Phe Lys Ser Thr Ser Val
260 265 270

Ile Leu Phe Leu Asn Lys Thr Asp Ile Leu Glu Glu Lys Ile Pro Thr
275 280 285

Ser His Leu Ala Thr Tyr Phe Pro Ser Phe Gln Gly Pro Lys Gln Asp
290 295 300

Ala Glu Ala Ala Lys Arg Phe Ile Leu Asp Met Tyr Thr Arg Met Tyr
305 310 315 320

Thr Gly Cys Val Asp Gly Pro Glu Gly Ser Lys Lys Gly Ala Arg Ser
325 330 335

Arg Arg Leu Phe Ser His Tyr Thr Cys Ala Thr Asp Thr Gln Asn Ile
340 345 350

Arg Lys Val Phe Lys Asp Val Arg Asp Ser Val Leu Ala Arg Tyr Leu
 355 360 365

Asp Glu Ile Asn Leu Leu
 370

<210> 5
 <211> 418
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 5

Met Gly Pro His Gly Asn Asp Ser Asp Phe Leu Leu Ala Pro Asn Gly
 1 5 10 15

Ser Arg Ala Pro Asp His Asp Val Thr Gln Glu Arg Asp Glu Ala Trp
 20 25 30

Val Val Gly Met Ala Ile Leu Met Ser Val Ile Val Leu Ala Ile Val
 35 40 45

Phe Gly Asn Val Leu Val Ile Thr Ala Ile Ala Lys Phe Glu Arg Leu
 50 55 60

Gln Thr Val Thr Asn Tyr Phe Ile Ile Ser Leu Ala Cys Ala Asp Leu
 65 70 75 80

Val Met Gly Leu Ala Val Val Pro Phe Gly Ala Ser His Ile Leu Met
 85 90 95

Lys Met Trp Asn Phe Gly Asn Phe Trp Cys Glu Phe Trp Thr Ser Ile
 100 105 110

Asp Val Leu Cys Val Thr Ala Ser Ile Glu Thr Leu Cys Val Ile Ala
 115 120 125

Val Asp Arg Tyr Val Ala Ile Thr Ser Pro Phe Lys Tyr Gln Ser Leu
 130 135 140

Leu Thr Lys Asn Lys Ala Arg Val Val Ile Leu Met Val Trp Ile Val
 145 150 155 160

Ser Gly Leu Thr Ser Phe Leu Pro Ile Gln Met His Trp Tyr Arg Ala
 165 170 175

Thr His Lys Lys Ala Ile Asp Cys Tyr Thr Glu Glu Thr Cys Cys Asp
 180 185 190

Phe Phe Thr Asn Gln Ala Tyr Ala Ile Ala Ser Ser Ile Val Ser Phe
 195 200 205

Tyr Val Pro Leu Cys Val Met Val Phe Val Tyr Ser Arg Val Phe Gln
 210 215 220

Val Ala Lys Arg Gln Leu Gln Lys Ile Asp Lys Ser Glu Gly Arg Phe
 225 230 235 240

His Ala Gln Asn Leu Ser Gln Val Glu Gln Asp Gly Arg Ser Gly His
 245 250 255

Gly Leu Arg Arg Ser Ser Lys Phe Cys Leu Lys Glu His Lys Ala Leu
 260 265 270

Lys Thr Leu Gly Ile Ile Met Gly Thr Phe Thr Leu Cys Trp Leu Pro
 275 280 285

Phe Phe Ile Val Asn Ile Val His Val Ile Arg Asp Asn Leu Ile Pro
 290 295 300

Lys Glu Val Tyr Ile Leu Leu Asn Trp Leu Gly Tyr Val Asn Ser Ala
 305 310 315 320

Phe Asn Pro Leu Ile Tyr Cys Arg Ser Pro Asp Phe Arg Ile Ala Phe
 325 330 335

Gln Glu Leu Leu Cys Leu Arg Arg Ser Ser Ser Lys Thr Tyr Gly Asn
 340 345 350

Gly Tyr Ser Ser Asn Ser Asn Gly Arg Thr Asp Tyr Thr Gly Glu Pro
 355 360 365

Asn Thr Cys Gln Leu Gly Gln Glu Arg Glu Gln Glu Leu Leu Cys Glu
 370 375 380

Asp Pro Pro Gly Met Glu Gly Phe Val Asn Cys Gln Gly Thr Val Pro
 385 390 395 400

Ser Leu Ser Val Asp Ser Gln Gly Arg Asn Cys Ser Thr Asn Asp Ser
 405 410 415

Pro Leu

Patentansprüche

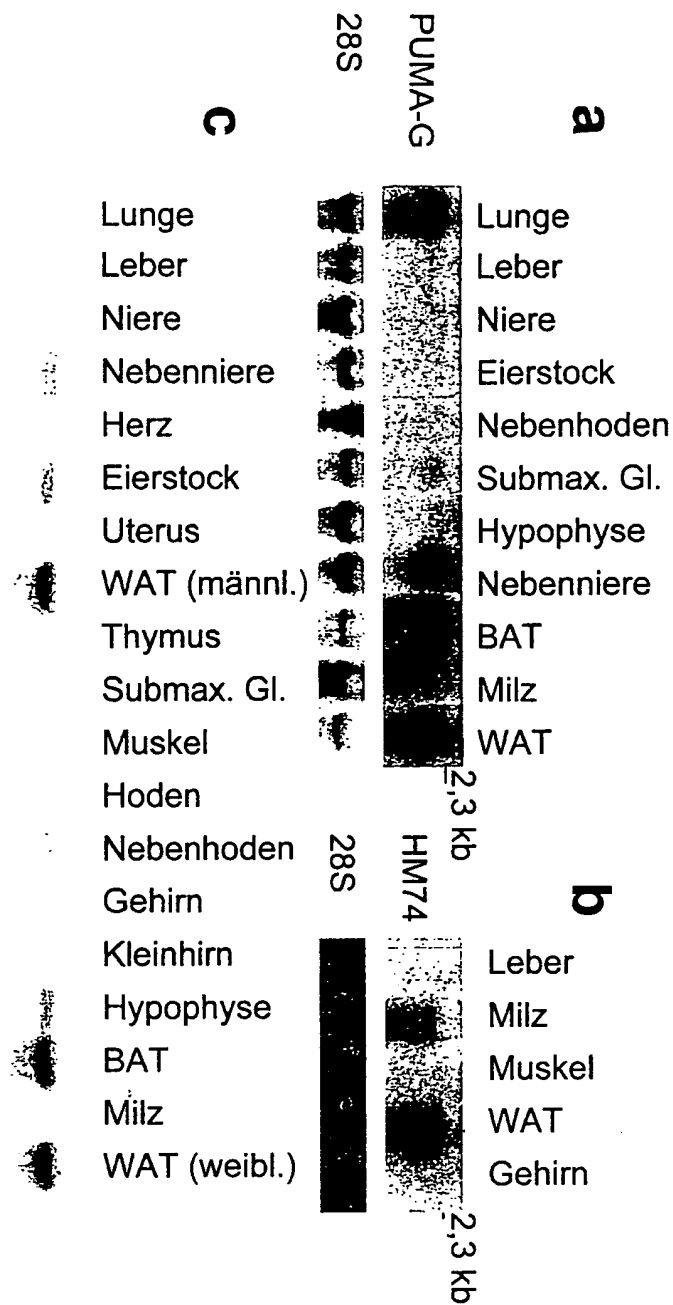
1. Verfahren zum Nachweis von antihyperlipidämisch wirkenden Verbindungen, umfassend
 - (a) das Zugeben einer zu testenden Verbindung zu einem System, welches mindestens ein erstes Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz, ausgewählt aus SEQ-ID-Nr.1 und SEQ-ID-Nr.2, oder ein biologisch aktives Derivat davon enthält, und
 - (b) das Bestimmen der antihyperlipidämischen Wirkung der in Schritt (a) zugegebenen Verbindung.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das System Zellen umfaßt, welche das erste Polypeptid oder ein biologisch aktives Derivat davon enthalten.
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Zellen Säugerzellen sind.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das System einen Träger umfaßt, auf welchem das erste Polypeptid oder ein biologisch aktives Derivat davon oder die Zellen oder Teile der Zellen aufgebracht sind.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4, wobei die Zellen ein zweites Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz, ausgewählt aus SEQ-ID-Nr.3 oder 4, oder ein biologisch aktives Derivat davon enthalten.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 5, wobei die Zellen ferner ein Protein mit der SEQ-ID-Nr. 5 oder Derivat davon enthalten.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 5, wobei die Zellen ein Genprodukt enthalten, welches durch die Bindung der zu testenden Verbindung an das erste Polypeptid oder ein biologisch aktives Derivat davon induzierbar ist.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 7, wobei das erste Polypeptid in den Zellen stabil oder transient exprimiert wird.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 8, wobei das zweite Polypeptid in den Zellen stabil oder transient exprimiert wird.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Bestimmung der antihyperlipidämischen Wirkung der zu testenden Verbindung in Schritt (b) durch direkte Messung der Bindungsaffinität der zu testenden Verbindung an das erste Polypeptid oder durch Messung der cAMP-Konzentration nach der Bindung der zu testenden Verbindung an das erste Polypeptid oder durch Messung der intrazellulären Ca-Konzentration nach der Bindung der zu testenden Verbindung an das erste Polypeptid oder durch Messung der Aktivierung der extrazellulär Signal-regulierten Kinase (erk) nach der Bindung der zu testenden Verbindung an das erste Polypeptid ausgeführt wird.

11. Kit zum Nachweis von antihyperlipidämisch wirkenden Verbindungen, enthaltend das in einem der Ansprüche 1 bis 11 definierte System.

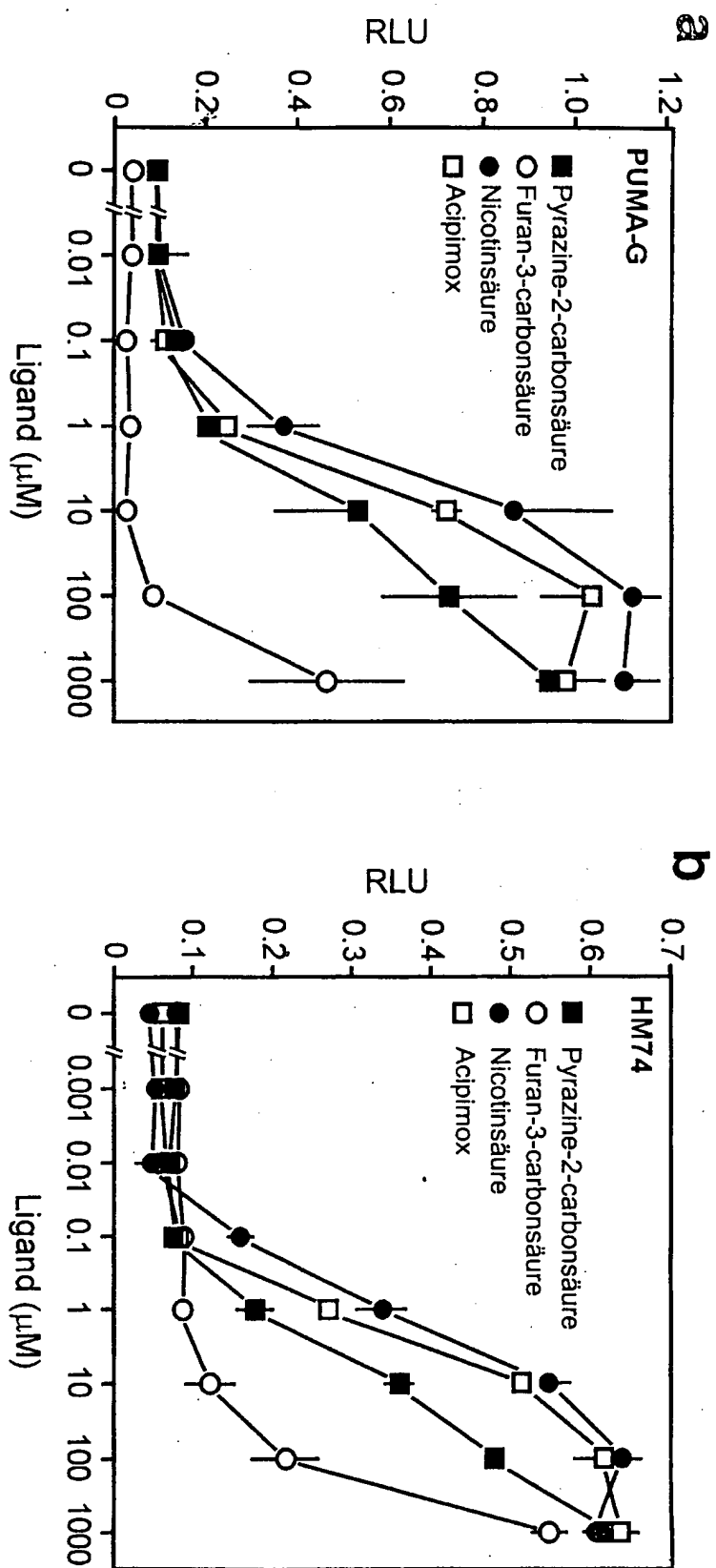
12. Verwendung eines Polypeptides mit einer Aminosäuresequenz, ausgewählt aus SEQ-ID-Nr.1 und SEQ-ID-Nr.2, oder eines biologisch aktiven Derivates davon als Bindungsprotein für antihyperlipidämisch wirkende Verbindungen.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

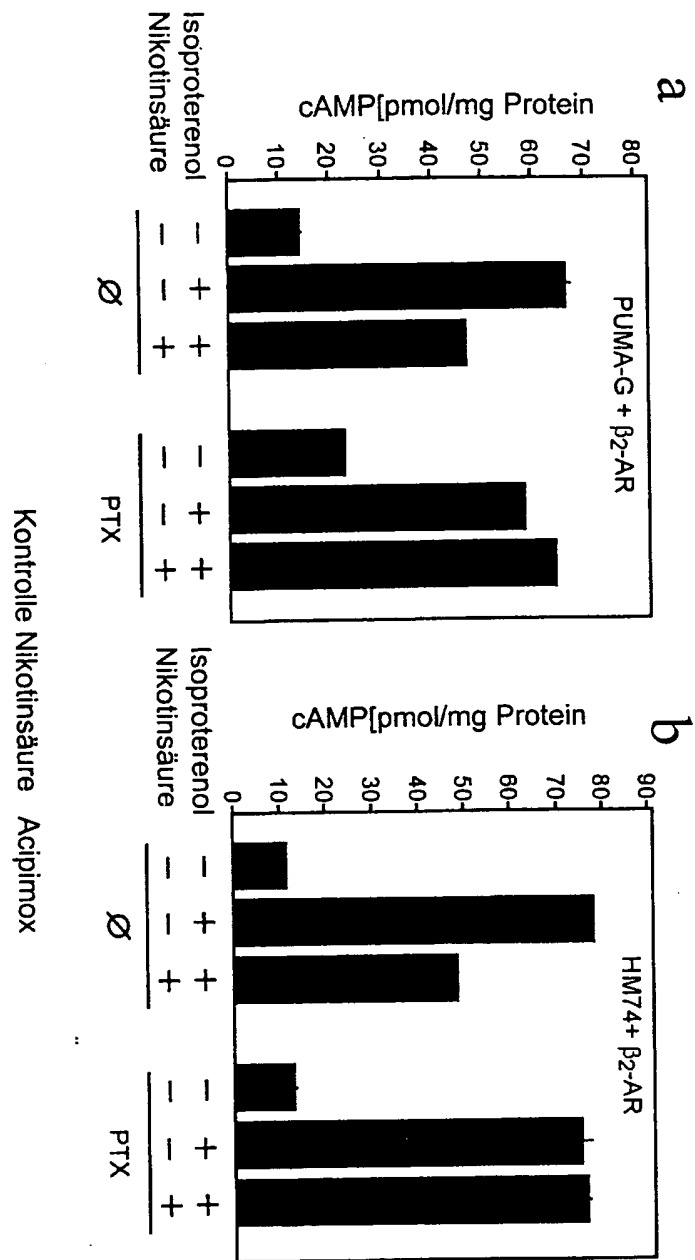
Anhängende Zeichnungen



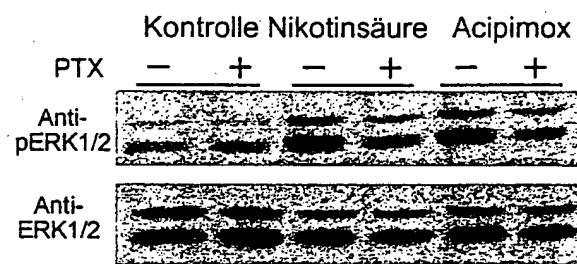
Figur 1



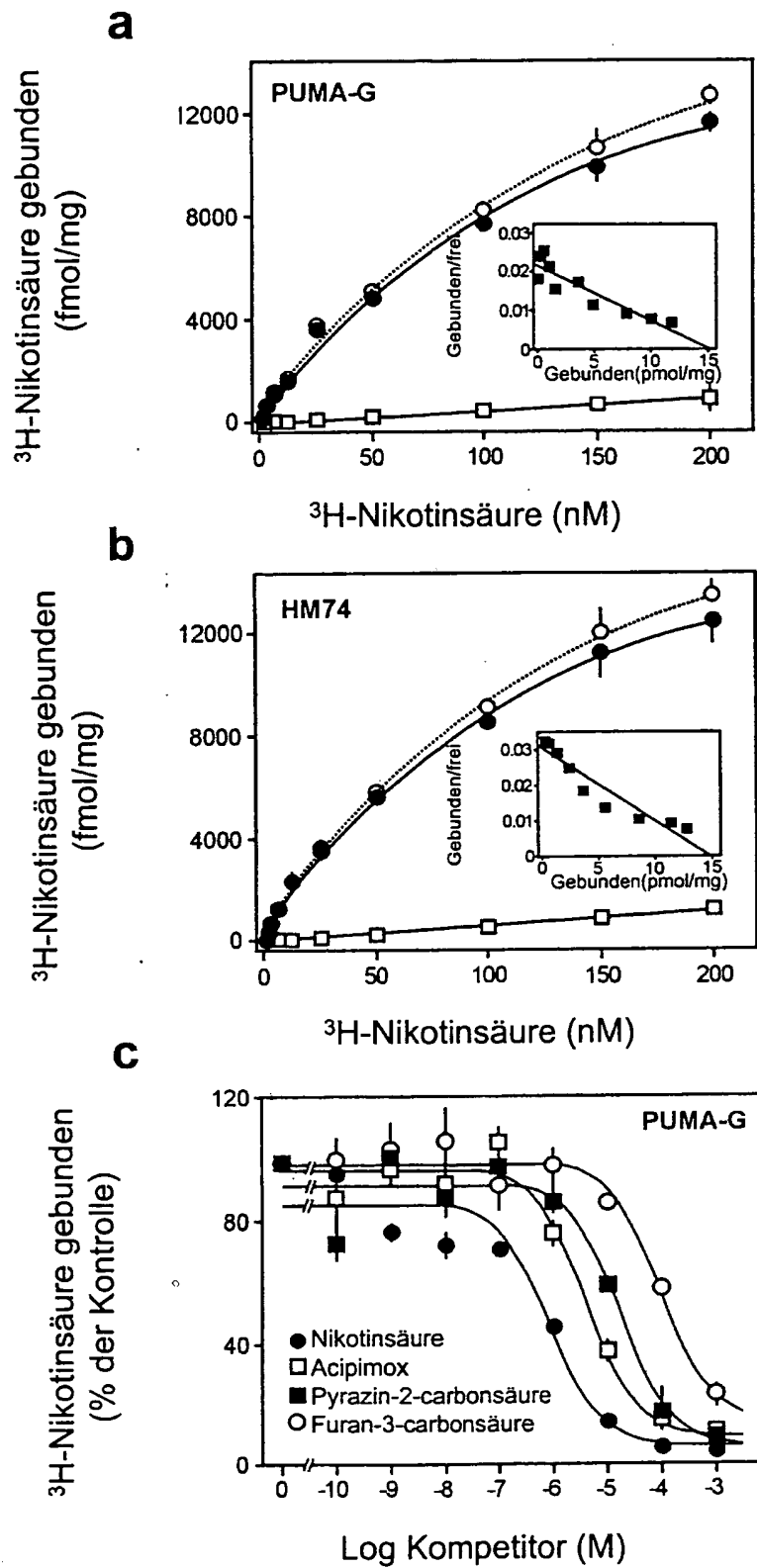
Figur 2



Figur 3



Figur 4



Figur 5

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)